DNA すいすい-R

DS-0003N

～DNA 簡易抽出バッファー～

バラ科植物葉向け

取扱説明書

Ver. 1.1

RIZO Inc.

目次

本製品の特長

本製品は、バラ科植物葉*からの DNA 簡易抽出に最適な抽出バッファーです。ポリフェノールが多く含まれ褐変を起こしやすく、ホモジナイズした溶液が高い粘性を示すようなイチゴ生葉やバラ生葉などに最適です。抽出した DNA はそのまま PCR 反応に使用できます。

*サンプルの状態によっては DNA 自体が分解され、抽出できない場合がございます。

内容物

抽出バッファー　85 mL（約 110 回分）
添加剤　（粉末）　２本
添加剤溶解液　　10 mL　×　１本

保存条件と使用期限

保存条件　冷蔵保存（4℃）して下さい。
使用期限　添加剤（添加剤溶解液を混合後）；１カ月*
　　　　　抽出バッファー；開封後６カ月
（*溶解後の添加剤は、小分けして冷凍することで長期保存可能です）

使用上の注意

本試薬は研究目的以外にご使用にならないでください。また、分子生物学に関する基本的知識のある方以外は取り扱わないでください

*記載内容や製品仕様、および価格に関しては予告なしに変更する場合がございます。

その他必要な試薬・機器

試薬

イソプロパノール（特級）
フェノール：クロロホルム（1：1、v/v）*
70% エタノール**
TE （10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）もしくは
蒸留滅菌水

*フェノールをトリスバッファー（pH 8.0）で飽和させたトリス飽和フェノールに対しクロロホルムを 1：1 の容積比で混合したものをご利用ください。又は、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール（25:24:1、SIGMA 社製 Cat. No. P2069 など）でも代用可能です。
**エタノール（分子生物学用）：蒸留滅菌水を 7：3 の容積比で混合したものをご利用ください。

機器

冷却微量高速遠心機

その他

1.5 ml チューブ
マイクロピペット（1,000 μl用、200 μl用）
ピペットチップ

実験を開始する前の準備

本製品に添付の添加剤溶解液（青ラベル）5ｍｌを添加剤（赤ラベル）に入れ、よく混合します*。この調製済み添加剤は DNA 抽出の直前に *DNA すいすい-R* に添加して使用します。

*調製後の添加剤は、使用期限が 1 カ月ですのでご注意ください。実験に使用するまで暗所で冷蔵保存（4℃）もしくは小分けして冷凍保存してください。

分析試料からの DNA 抽出プロトコール

分析試料 1 検体あたり、720 μl の *DNA すいすい-R* と
80μl の調製済添加剤を混合し[注①]、これを分析試料数分ご用意下さい。

1. 新しい 1.5 ml チューブに、400 μl の添加剤入り *DNA すいすい-R*を入れた後[②]、10～50 mg の分析試料を加えます[注③④]。

2. マイクロチューブ用ペッスルなど[注⑤]で分析試料をホモジナイズします。

3. 400 μl の添加剤入り *DNA すいすい-R*をさらに加え、転倒混和します。

4. フェノール：クロロホルム（1：1、v/v）を 500 μl 加え、転倒混和します。

5. 15,000 rpm、室温（20～25℃）で 10 分間遠心分離を行います。

6. 上清 600 μl を新しい 1.5 ml チューブにとり、イソプロパノールを 200 μl（上清の 1/3 量）添加し、よく混和します。

7. 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行います。

8. 上清 600 μl を新しい 1.5 ml チューブにとり、イソプロパノールを 300 μl（上清の 0.5 倍量）添加し、よく混和します。

9. 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行います。

10. 上清を捨て[注⑥]、70% エタノールを 1,000 μl 入れ、沈澱の洗浄を行います。

11. 15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離を行います。

12. 上清を捨て、沈澱を乾燥（風乾）[注⑦]します。

13. 50～100 μl の TE もしくは滅菌水に溶解し[注⑧]、PCR 反応用試料とします。

***注①～⑦については次ページの「注解」をご参照ください。**

注解

注①調製した添加剤は使用直前に *DNA すいすい-R* に加え、試料数分ご準備下さい。*DNA すいすい-R* に添加剤を加えた後、1 日以上経過したものはご使用にならないで下さい。

注②冷凍保存した組織の場合は、解凍しないうちに抽出バッファーへ浸漬して下さい。尚、分析試料を多く入れ過ぎますとDNA の収量の低下や多量の夾雑物持ち込みの原因となり、PCR 反応に影響を及ぼす可能性が考えられますので、ご注意ください。

注③完全展開葉は避け、可能な限り新しく展開した若葉を分析試料に選んでください。完全展開葉ですと細胞壁等が発達しているために十分なホモジナイズが難しく、また、ポリフェノール化合物の蓄積量も多い為、最終的に DNA の収量と質が低下する可能性が考えられます。

注④生葉の場合、分析試料によっては抽出バッファーをプロトコールの約半分量にしてホモジナイズした方がより操作しやすい場合がございます。この場合、抽出バッファーの合計量（*DNA すいすい-R* ＋ 添加剤）が最終的に 800 μl になるようホモジナイズ後に加え、転倒混和して下さい。

注⑤1,000μl 用ピペットチップの先を、アルコールランプやライター等で炙り、先端の穴が閉じたものなどを使用しても十分なホモジナイズが可能です。

注⑥沈澱が流出しないようご注意ください。

注⑦乾燥させすぎると TE もしくは滅菌水への溶解が困難になります。

注⑧分析試料の生物種や状態、PCR 反応系の違いにより最適量が異なりますので、それぞれの分析試料に合わせて適宜、調製して下さい。

本プロトコールは、微量サンプルからの DNA 簡易抽出用に考案されています。

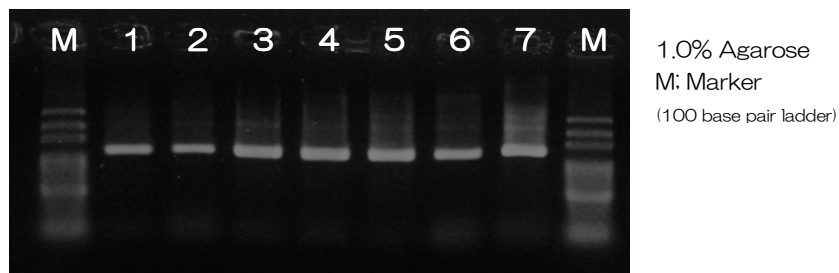
トラブルシューティング

問題	考えられる原因	対策
DNA の収量が低い。	試料のホモジナイズが不十分である可能性が考えられます。	試料をできるだけ丁寧にホモジナイズして下さい。
	試料から本製品（抽出バッファー）への DNA 抽出が不十分である可能性が考えられます。	本製品と共に試料をホモジナイズした後、よく転倒混和を行ってから次の操作に移ってください。
イソプロパノール添加後に多量の白色沈澱が生じ、70%エタノールによる洗浄後も残存している。	分析試料に多量のタンパク質や脂質が含まれている可能性が考えられます。	DNA 抽出プロトコールの「4」および「5」の操作をさらに繰り返し、タンパク質や脂質の除去を行ってください。

実験例

バラ科植物の生葉を用いた実験

本製品を使用して DNA 簡易抽出を行い、18S rRNA 遺伝子検出用プライマー対（1,131 bp が増幅）を使用して PCR を行いました。

1.0% Agarose
M: Marker
(100 base pair ladder)

1 バラ（葉）
2 イチゴ（葉）
3 リンゴ（葉）
4 サクラ（葉）
5 ウメ（葉）
6 ソルダム（葉）
7 セイヨウスモモ（葉）

（生葉約 50 mg の組織から DNA 抽出を行いました。）

（PCR 反応系）

Template DNA*	1～6 （μl）
10×Buffer	3
dNTP mixture (2.0mM each)	3
primer (4 pmol each/μl)	3
Taq** (5units/μl)	0.25
H_2O	
Total	30 μl

*DNA 抽出液を 2～120 倍に希釈したものを使用。
**Stratagene　Paq5000 を使用

（PCR 条件）

95℃ 2 min.
94℃ 35 sec.
55℃ 30 sec.　35 cycles
72℃ 75 sec.
72℃ 7 min.

DNAすいすいーR

お問い合わせ先

株式会社リーゾ
研究部
茨城県つくば市天久保 2-9-2-B201
電話；029-852-9351 FAX；020-4623-5611
E-mail；info@rizo.co.jp
ホームページ；http://rizo.co.jp/